

18/5/2  
DIALOG(R)File 351:Derwent WPI  
(c) 2001 Derwent Info Ltd. All rts. reserv.

010678777

WPI Acc No: 1996-175732/199618

XRAM Acc No: C96-055505

Fusion protein comprising human serum albumin contg. peptide inserted at arbitrary position - useful for, e.g. inhibiting cancer metastasis

Patent Assignee: ASahi GLASS CO LTD (ASAG )

Number of Countries: 001 Number of Patents: 001

Patent Family:

Patent No	Kind	Date	Applicat No	Kind	Date	Week
JP 8053500	A	19960227	JP 94209368	A	19940811	199618 B

Priority Applications (No Type Date): JP 94209368 A 19940811

Patent Details:

Patent No	Kind	Lan Pg	Main IPC	Filing Notes
JP 8053500	A	24	C07K-019/00	

Abstract (Basic): JP 8053500 A

A fusion protein, prepared by introducing peptide(s) into at least one arbitrary position in a polypeptide chain of human serum albumin, is new. Also claimed are: (1) a gene (I) encoding the fusion protein; (2) a recombinant vector contg. (I); and (3) a host cell transformed with the vector of (2) and capable of producing the fusion protein.

USE - The gene is used for production of a fusion protein capable of demonstrating its physical activity sufficiently without destruction of the stereostructure of human serum albumin protein.

ADVANTAGE - A fusion protein eg. a fusion protein for inhibiting cancer metastasis, which could be prepared in the prior art only by a combination of a chemical synthetic method and a binding method, can be produced directly and efficiently for the first time by recombinant DNA technology, thus realising the stable supply in industrial scale processes of a fusion protein for inhibiting cancer metastasis as pharmaceuticals.

Dwg.0/8

Title Terms: FUSE; PROTEIN; COMPRISE; HUMAN; SERUM; ALBUMIN; CONTAIN;  
PEPTIDE; INSERT; ARBITRARY; POSITION; USEFUL; INHIBIT; CANCER; METASTASIS  
Derwent Class: B04; D16

International Patent Class (Main): C07K-019/00

International Patent Class (Additional): C12N-001/19; C12N-015/09;

C12P-021/02; C12R-001-645

File Segment: CPI

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平8-53500

(43)公開日 平成8年(1996)2月27日

(51)Int.Cl. <sup>6</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 0 7 K 19/00		8318-4H		
C 1 2 N 1/19		8828-4B		
15/09	Z N A			
C 1 2 P 21/02		C 9282-4B		
		9281-4B		
		C 1 2 N 15/ 00		Z N A A
審査請求 未請求 請求項の数20 F D (全 24 頁) 最終頁に続く				

(21)出願番号 特願平6-209368

(22)出願日 平成6年(1994)8月11日

(71)出願人 000000044

旭硝子株式会社

東京都千代田区丸の内2丁目1番2号

(72)発明者 東田 英毅

神奈川県横浜市神奈川区羽沢町1150番地

旭硝子株式会社中央研究所内

(72)発明者 村上 喜美子

神奈川県横浜市神奈川区羽沢町1150番地

旭硝子株式会社中央研究所内

(72)発明者 浜 祐子

神奈川県横浜市神奈川区羽沢町1150番地

旭硝子株式会社中央研究所内

(74)代理人 弁理士 長谷川 洋子 (外2名)

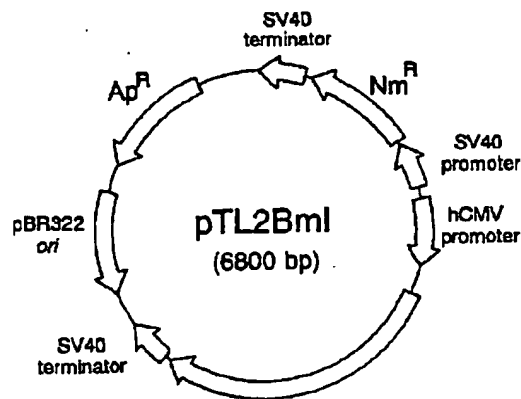
最終頁に続く

(54)【発明の名称】 融合タンパク質および該タンパク質をコードする遺伝子

(57)【要約】

【目的】 ヒト血清アルブミンタンパク質の立体構造を破壊することなく、しかも生理活性を十分に発揮し得る生理活性を有する融合タンパク質を遺伝子工学的に作製し、提供する。

【構成】 ヒト血清アルブミンのポリペプチド鎖の少なくとも1つ以上の所望の位置に、望ましくは、アミノ末端、カルボキシル末端、第1〜2ドメイン間あるいは第2〜3ドメイン間に、生理活性を有するペプチドを導入した融合タンパク質およびこれをコードする遺伝子、並びに、該遺伝子を用いて上記融合タンパク質を遺伝子組換え手法によって製造する方法。



癌転移阻害蛋白質遺伝子

1

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 ヒト血清アルブミンのポリペプチド鎖の少なくとも1つ以上の所望の位置に生理活性を有するペプチドを導入してなる融合タンパク質。

【請求項2】 生理活性を有するペプチドの導入位置が、ヒト血清アルブミンのポリペプチド鎖のアミノ末端、カルボキシル末端、第1～2ドメイン間あるいは第2～3ドメイン間のうちのいずれか1箇所若しくはこれらの任意の組み合わせの位置である、請求項1に記載の融合タンパク質。

【請求項3】 生理活性を有するペプチドが配列番号1のアミノ酸配列で表される、請求項1または2に記載の融合タンパク質。

【請求項4】 請求項1～3のいずれかに記載の融合タンパク質をコードする遺伝子。

【請求項5】 生理活性を有するペプチドの導入位置がヒト血清アルブミンのポリペプチド鎖のアミノ末端である、配列番号2のアミノ酸配列で表される、請求項1～3のいずれかに記載の融合タンパク質。

【請求項6】 配列番号3の塩基配列で表される、請求項5に記載の融合タンパク質をコードする遺伝子。

【請求項7】 生理活性を有するペプチドの導入位置がヒト血清アルブミンのポリペプチド鎖の第1～2ドメイン間である、配列番号4のアミノ酸配列で表される、請求項1～3のいずれかに記載の融合タンパク質。

【請求項8】 配列番号5の塩基配列で表される、請求項7に記載の融合タンパク質をコードする遺伝子。

【請求項9】 生理活性を有するペプチドの導入位置がヒト血清アルブミンのポリペプチド鎖の第2～3ドメイン間である、配列番号6のアミノ酸配列で表される、請求項1～3のいずれかに記載の融合タンパク質。

【請求項10】 配列番号7の塩基配列で表される、請求項9に記載の融合タンパク質をコードする遺伝子。

【請求項11】 生理活性を有するペプチドの導入位置がヒト血清アルブミンのポリペプチド鎖のカルボキシル末端である、配列番号8のアミノ酸配列で表される、請求項1～3のいずれかに記載の融合タンパク質。

【請求項12】 配列番号9の塩基配列で表される、請求項11に記載の融合タンパク質をコードする遺伝子。

【請求項13】 請求項6、8、10および12のいずれかに記載の遺伝子を含有する組換えベクター。

【請求項14】 前記組換えベクターがプラスミドpTL2Bm1-1000である、請求項13に記載の組換えベクター。

【請求項15】 前記ベクターがプラスミドpTL2Bm1-0100である、請求項13に記載の組換えベクター。

【請求項16】 前記ベクターがプラスミドpTL2Bm1-0010である、請求項13に記載の組換えベクター。

2

【請求項17】 前記ベクターがプラスミドpTL2Bm1-0001である、請求項13に記載の組換えベクター。

【請求項18】 請求項13～17のいずれかに記載の組換えベクターで宿主細胞を形質転換してなる、融合タンパク質を産生し得る形質転換体。

【請求項19】 宿主細胞が分裂酵母シゾサッカロミセス・ボンベ (*Schizosaccharomyces pombe*) である、請求項18に記載の形質転換体。

10 【請求項20】 請求項18または19に記載の形質転換体を培養し、培養物中に産生された融合タンパク質を単離し、所望により精製することからなる該融合タンパク質の製造方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、生理活性、特に癌転移阻害活性を有する融合タンパク質およびこれをコードする遺伝子、該遺伝子を含有する組換えベクター、該組換えベクターによって形質転換された宿主細胞の形質転換体並びに該形質転換体を用いる融合タンパク質の製造方法に関する。

【0002】

【従来の技術】 癌の治療には主として外科的療法、放射線療法および化学療法が行われているが、癌の再発や転移の防止という点ではいまだ満足すべき治療効果が挙げられていない。

【0003】 現在用いられている多くの制癌剤は、核酸あるいはタンパク質の生合成系を阻害し、癌細胞を死に至らしめるものである。しかしながらこれらの制癌剤では、癌細胞と正常細胞との区別が困難なため、その効果には、特に副作用の面で大きな問題が内在している。またこれらの制癌剤は原発巣を縮小させることによって治療するものであるが、癌の治療で常に問題になるのは癌細胞が原発巣から離れ、他の臓器に転移し、そこで増殖し致命的な結果を招くことである。したがって癌の根本的治療のためには、癌細胞の増殖抑制とともに、転移に対して有効な抑制効果を示す制癌剤の開発が望まれている。

【0004】 癌転移の機構の解明には多くの研究がなされ、転移の抑制に関する物質の検索も広く行なわれてきた。癌細胞は原発巣から遊離した後、血管中に侵入する。そして血管壁に接着後、血管内皮細胞層の下に潜り込み細胞外基質を破壊し、標的臓器の実質中に浸潤侵入する。このような各ステップを経て癌細胞は他の臓器に転移すると考えられている (L.A. Liotta et al.: Lab. Invest., 49, 636-649(1983))。よって癌転移阻害剤開発のためには、上記の各ステップのいずれかを抑制するものが開発されればよいと考えられる。例えば、癌細胞が細胞外基質と接着するのを阻害するもの (例えば、

50 N.J. Humphries et al.: Science, 223, 467-470 (1983)

3

6) )、中皮細胞層や血管内皮細胞層などの下層への浸潤を阻害する物質(例えば、A. Isoai et al.: Jpn. J. Cancer Res., 81, 909-914 (1990))、細胞外基質の分解を阻害する物質(例えば、R.M. Schultz et al.: Cancer Res., 48, 5539-5545 (1988))等が挙げられる。

【0005】本発明者らは従前に、癌転移阻害活性を有するペプチドと生体高分子との複合体を化学的結合法により作製している。すなわち、配列表の配列番号1のアミノ酸で表される癌阻害活性を有するペプチド(特開平3-34993号公報、A. Isoai et al.: Jpn. J. Cancer Res., 81, 909-914 (1990) および A. Isoai et al.: Cancer Res., 52, 1422-1426 (1992) )と、血清アルブミンなどの生体高分子とを水溶性カルボジミドで結合させた形態において、優れた癌細胞浸潤阻害活性並びに癌転移抑制活性をもつということを確認している(特開平4-254000号、同4-300899号、同4-300900号公報および Biochem. Biophys. Res. Commun., 192, 7-14 (1993) )。

【0006】このように有用な癌転移阻害活性を有する複合体(融合タンパク質)は、通常化学的タンパク質結合法によって作製される。しかしながらその方法はステップ数が多く、また不純物である不完全合成産物の分離を行なわなければならない。通常これらの方法は煩雑であり、また効率よく大量生産することが難しく、特に609アミノ酸残基を有する該融合タンパク質では、従来の化学的タンパク質-ペプチド結合法によることは、コスト的にも設備的にも必ずしも満足できるものではなかった。

【0007】

【発明が解決しようとする課題】本発明はかかる事情に鑑みてなされたもので、生理活性を有するペプチド、とりわけ配列番号1のアミノ酸配列で表されるペプチド(癌転移阻害ペプチド)と血清アルブミン等の生体高分子との複合体(癌転移阻害融合タンパク質)を、従来の化学的タンパク質-ペプチド結合法に代えて、遺伝子組換え技術を用いて、より効率的な遺伝子発現並びに癌転移阻害融合タンパク質の生産をなし得るための技術を提供することにある。

【0008】

【課題を解決するための手段】本発明者らは上記課題を解決するために鋭意研究を重ね、遺伝子組換え技術を用いて生理活性を有する融合タンパク質を生産する新規な系を創出し、該融合タンパク質を生産することに成功した。具体的には、生理活性を有する融合タンパク質をコードする遺伝子を設計、作製し、すでに確立されている異種タンパク質生産用のベクターに該遺伝子を組み込み、得られた組換えベクターを宿主細胞に導入し、形質転換体を作製することにより、生理活性を有する融合タンパク質の生産を達成し得るというものである。

【0009】すなわち本発明によれば、ヒト血清アル

4

ミンのポリペプチド鎖の少なくとも1つ以上の所望の位置に生理活性を有するペプチドを導入してなる融合タンパク質が提供される。

【0010】ここで、上記生理活性を有するペプチドの導入位置は、ヒト血清アルブミンのポリペプチド鎖のアミノ末端、カルボキシル末端、第1~2ドメイン間あるいは第2~3ドメイン間のうちのいずれか1箇所若しくはこれらの任意の組み合わせの位置であるのが好ましい。

【0011】また本発明によれば、上記融合タンパク質をコードする遺伝子が提供される。また本発明によれば、上記遺伝子を含有する組換えベクターが提供される。

【0012】また本発明によれば、上記組換えベクターで宿主細胞を形質転換してなる、融合タンパク質を産生し得る形質転換体が提供される。

【0013】さらに本発明によれば、上記形質転換体を培養し、培養物中に産生された融合タンパク質を単離し、所望により精製することからなる該融合タンパク質の製造方法が提供される。

【0014】以下、本発明について詳述する。なお「生理活性を有するペプチド」については、便宜上、癌転移阻害活性を有するペプチド(癌転移阻害ペプチド)で代表させて説明する。

【0015】上述したように、配列番号1のアミノ酸配列で表されるペプチド(癌転移阻害ペプチド)と血清アルブミン等の生体高分子との複合体(複合体)が優れた癌転移阻害活性をもつということが本発明者らによりすでに確認されている。しかしながら、上記複合体は化学的タンパク質結合法により作製されたものであり、また上記癌転移阻害ペプチドと血清アルブミンとの両者の結合関係は、水溶性カルボジミドで結合された状態であるということ以外、明確でない。

【0016】本発明者らは、ヒト血清アルブミンタンパク質のポリペプチド鎖の所定の位置に癌転移阻害ペプチドを導入することによって、ヒト血清アルブミンのタンパク質立体構造を破壊することなくしかも癌転移阻害活性を十分に発揮し得る癌転移阻害融合タンパク質を遺伝子工学的に作製することに成功した。

【0017】具体的には、まずヒト血清アルブミンをコードする遺伝子と、癌転移阻害ペプチドをコードする遺伝子をそれぞれ作製し、前者のポリペプチド鎖の所定の位置に後者を導入し結合させて、癌転移阻害融合タンパク質をコードする遺伝子を作製する。

【0018】ヒト血清アルブミンをコードする遺伝子は、好ましくは癌転移阻害ペプチド遺伝子を導入するのに適するように改変したものが用いるのがよい。この改変ヒト血清アルブミン遺伝子の作製のために用いる天然のヒト血清アルブミン遺伝子は、例えば、ヒト肝臓cDNAライブラリーよりプラスミドpILMALB5(国

立予防衛生研究所遺伝子バンク)の制限酵素PvuII-HindIII断片をプローブとしてクローニングすること等により得ることができる。なお、ヒト血清アルブミン遺伝子には、そのアミノ酸配列が互いに若干異なっているという多型が報告されており、上記の方法でクローニングしたヒト血清アルブミン遺伝子もその範囲に入るものである。本発明における「ヒト血清アルブミン」とは、これらすべての多型のものを含み得る。

【0019】改変の対象部位である癌転移阻害ペプチド遺伝子導入部位は、ヒト血清アルブミンのポリペプチド鎖中の任意の位置に設定することが可能であるが、活性を十分に発揮させ得ることを考慮すると、タンパク質の表面に位置しており、かつ立体構造を破壊することのない位置であることが好ましい。例えば、アミノ末端(N末端)あるいはカルボキシル末端(C末端)など、ヒト血清アルブミンの立体構造の形成に影響を及ぼさないと考えられる位置が望ましい。また、ヒト血清アルブミンの立体構造はX線結晶解析によって詳細に検討されており(Xiao, M.H., and Carter, D.C. Nature, 358:209-215, 1992)、3個あるドメインの間、すなわち第1~2ドメイン間あるいは第2~3ドメイン間も、導入部位の候補となり得る。導入する癌転移阻害ペプチドの個数は、必要に応じて、単一の位置、ないしは複数の位置に、単数あるいは複数個導入し得る。

【0020】ヒト血清アルブミン遺伝子の改変は、例えば上記癌転移阻害ペプチド遺伝子導入位置に、制限酵素切断部位を導入することなどによって行われる。導入する制限酵素切断部位は、既知の制限酵素によって認識されるものであればよい。望ましくは、ヒト血清アルブミン中にほとんど存在しない切断部位であり、かつ切断酵素が容易に入手できるものが望ましい。また、当然天然のアミノ酸配列を一切変更しないことと同時に、塩基配列もできるだけ変更しないことが望ましい。以上の点を鑑みて、アミノ末端およびカルボキシル末端に制限酵素AflIII切断部位を、第1~2ドメイン間に制限酵素HindIII切断部位を、第2~3ドメイン間に制限酵素EcoRI切断部位をそれぞれ導入するのが最も好ましい。なお、制限酵素切断部位導入法としては、当業分野で常用されているPCR法等が好適に用いられる。

【0021】そして、癌転移阻害ペプチド遺伝子の導入の際には、上記制限酵素切断部位を各制限酵素にて切断し、ここに同様に制限酵素で消化して末端調節を行った癌転移阻害ペプチド遺伝子を組み込むことによって、癌転移阻害融合タンパク質をコードする遺伝子を作製する。

【0022】なお、上記の癌転移阻害ペプチド遺伝子の塩基配列は、配列番号1のアミノ酸配列で表されるペプチドをコードするものであり、理論的には幾通りもの数多くの配列が考えられ得るが、望ましくは遺伝子組換え

に用いる宿主細胞のコドン使用頻度に合わせたものがよく、最も多頻度で使用されるコドンを用いて設計するのがよい。

【0023】ここで、用いる宿主細胞としては特に限定されるものではないが、望ましくは培養方法が容易で、低コストで培養できる微生物がよく、例えば大腸菌(*Escherichia coli*)、各種酵母類、枯草菌、糸状菌等、当業分野で常用されている宿主細胞等が挙げられる。原核生物を宿主細胞として用いる形質転換方法では必ずしも全てのポリペプチドに対して有効ではなく、真核生物由来のタンパク質の複雑な翻訳後修飾あるいは天然体と同じ立体構造を再現することは必ずしも容易ではない。また特有のエンドトキシンが存在する場合は、最終製品の夾雑物になる可能性があり、好ましくない。このため好ましくは、エンドトキシンを含まず、培養方法も確立しており、従来より醗酵並びに食品工業で用いられており、人体に関する安全性も確立されている各種酵母類がよい。このなかでも特に、遺伝学的並びに分子生物学的に動物細胞に近い性質をもつとされ、より天然体に近い遺伝子産物が得られることが期待される分裂酵母シゾサッカロミセス・ボンベ(*Schizosaccharomyces pombe*)が最も好ましい。このシゾサッカロミセス・ボンベの菌株としては、例えば寄託番号ATCC38399(1eu-32h-)やATCC38436(ura4-294h-)等としてアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション(ATCC)に寄託されているものが挙げられ、入手可能である。

【0024】したがって本発明においては、配列番号1で表される癌転移阻害ペプチドをコードする遺伝子は、シゾサッカロミセス・ボンベでの高発現に至適なコドンを用いて設計し、合成したものであるのが好ましい。シゾサッカロミセス・ボンベの最適コドン使用頻度は、例えばA. Nasim et al.: Molecular Biology of the Fission Yeast, p.263, Academic Press (1983)等から知ることができる。本発明者らは種々研究を重ねた結果、配列番号25の塩基配列で表される遺伝子が最も好適であるとの結論を得、設計、合成した(ただし、配列番号25の塩基配列は、翻訳開始シグナル(ATG)および翻訳終了シグナル(TAA)を付加している)。なお、遺伝子の作製(合成)は、トリエステル法(Nuc. Acid. Res. 10, p.6553, (1982))やホスホアミダイト法(Tetrahedron Letters 22, p.1859, (1981))などの種々の方法がすでに開発されており、いずれの方法を用いてもよい。またDNA合成機器(DNAシンセサイザー)等が市販されているので、それらを用いてもよい。

【0025】次に、上記のようにして作製した新規の癌転移阻害融合タンパク質遺伝子をベクターに組み込んで組換えベクターを作製する。用いるベクターは特に限定されるものではないが、宿主細胞内で自律的に複製可能であって、癌転移阻害融合タンパク質合成遺伝子を組み

込み得る挿入部位をもち、さらにこの組み込んだ合成遺伝子を宿主細胞内で発現せしめることを可能とする領域を有する必要がある。このようなベクターとして、例えば本発明者らがすでに創出に成功しているシゾサッカロミセス・ボンベを宿主とする外来遺伝子発現ベクターpTL2M(特願平5-249310号明細書)等を有利に用いることができ、これらのベクターに上記合成遺伝子を容易に組み込み得る。

【0026】次いで上記組換えベクターを宿主細胞内に導入し、形質転換体を得る。組換えベクターの宿主細胞内への導入法は、従来慣用的に用いられている方法により行うことができ、コンピテント細胞法、プロトプラスト法、リン酸カルシウム共沈法、エレクトロポレーション法、マイクロインジェクション法、リボソーム融合法、パーティクル・ガン法等、種々のものが挙げられるが、用いる宿主に応じてそれぞれ任意の方法を取り得る。シゾサッカロミセス・ボンベを宿主とする場合は、例えば酢酸リチウム法(K. Okazaki et al., Nucleic Acids Res., 18, 6485-6489(1990))等によって効率よく形質転換体を得ることができる。

【0027】このようにして得られた形質転換体を培養することにより、培養物中に癌転移阻害融合タンパク質が産生される。これを公知の方法で単離し、場合により精製することにより、目的とする癌転移阻害融合タンパク質が得られる。

【0028】形質転換体を培養するための培地は公知であり、YPD培地などの栄養培地(M. D. Rose et al., "Methods In Yeast Genetics", Cold Spring Harbor Laboratory Press(1990)r)や、MB培地などの最少培地(K. Okazaki et al., Nucleic Acids Res., 18, 6485-6489(1990))等を用いることができる。形質転換体の培養は、通常16~42℃、好ましくは25~37℃で、8~168時間、好ましくは24~72時間行う。振盪培養と静置培養のいずれも可能であるが、必要に応じて攪拌や通気を加えてもよい。

【0029】培養物中に産生した融合タンパク質の単離・精製法としては、公知の塩析または溶媒沈殿法等の溶解度の差を利用する方法、透析、限外濾過またはゲル電気泳動法等の分子量の差を利用する方法、イオン交換クロマトグラフィー等の荷電の差を利用する方法、アフィニティークロマトグラフィー等の特異的親和性を利用する方法、逆相高速液体クロマトグラフィー等の疎水性の差を利用する方法、等電点電気泳動法等の等電点の差を利用する方法等が挙げられる。

【0030】単離・精製した融合タンパク質の確認方法としては、公知のウエスタンブロッティング法や活性測定法等が挙げられる。また、精製された融合タンパク質は、アミノ酸分析、アミノ末端分析、一次構造解析などによりその構造を明らかにすることができる。

【0031】なお、本明細書中、配列表の配列番号2の

アミノ酸配列で表される融合タンパク質は、ヒト血清アルブミンのポリペプチド鎖のN末端に配列番号1の癌転移阻害ペプチドを導入したものであり；配列番号4のアミノ酸配列で表される融合タンパク質は、ヒト血清アルブミンのポリペプチド鎖の第1~2ドメイン間に配列番号1の癌転移阻害ペプチドを導入したものであり；配列番号6のアミノ酸配列で表される融合タンパク質は、ヒト血清アルブミンのポリペプチド鎖の第2~3ドメイン間に配列番号1の癌転移阻害ペプチドを導入したものであり；配列番号8のアミノ酸配列で表される融合タンパク質は、ヒト血清アルブミンのポリペプチド鎖のカルボキシル末端に配列番号1の癌転移阻害ペプチドを導入したものである。配列番号3、5、7および9の塩基配列は、それぞれ、配列番号2、4、6および8の各アミノ酸配列で表される癌転移阻害融合タンパク質をコードする遺伝子である。

【0032】

【実施例】以下の実施例により本発明をより具体的に説明する。ただし、本発明はこれらの実施例によりその技術範囲が限定されるものではない。また実施例中の各操作については、特に記載したもの以外は、当業分野で常用されている方法(例えばJ. Sambrook et al.: Molecular Cloning. A Laboratory Manual. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, USA, 1989.)に従った。

【0033】【実施例1】癌転移阻害ペプチドをコードする配列番号25の塩基配列で表される遺伝子の作製  
配列番号1のアミノ酸配列をもとに、シゾサッカロミセス・ボンベのコドン使用頻度(Nasim, A. et al: Molecular Biology of the Fission Yeast, Academic Press, 1989, p263.)に合せて、配列番号10および11の塩基配列で表される2本の一本鎖オリゴDNAを、DNA自動合成装置(Applied Biosystems)を用いて合成した。なお、配列番号10の塩基配列は、5'末端に制限酵素BamHIへの挿入部位と開始コドンATGを、3'末端に終始コドンTAAと制限酵素HindIIIへの挿入部位を導入した遺伝子のセンス鎖であり、配列番号11の塩基配列はそのアンチセンス鎖である。脱保護、精製後、これら2本を70℃でアニーリングした。

【0034】一方、これとは別にプラスミドpUC19(宝酒造(株)製)を、制限酵素BamHI(宝酒造(株)製)およびHindIII(宝酒造(株)製)で二重消化し、フェノール抽出、エタノール沈澱による精製の後、アガロースゲル電気泳動し、約2600塩基対に相当するバンドを切出し、DNA-REP(旭硝子(株)製)を用いたガラスビーズ法で精製した。

【0035】これら両者の断片を、DNAライゲーションキット(宝酒造(株)製)を用いてライゲーションした。これを大腸菌JM109株(宝酒造(株)製)に導入して形質転換した後、アンピシリン耐性を持ち、かつ

X-gal プレート上で白コロニーを提示するポジティブクローンをスクリーニングし、目的のプラスミドすなわち制限酵素BamHIおよびHindIII二重消化時に約70塩基対の切断断片を示すpI2Aを得た。アルカリ-SDS法に従ってpI2Aを大量調製し、制限酵素地図の作製および塩基配列決定によって、配列番号25の塩基配列を持ったプラスミドであることを確認した。

【0036】【実施例2】配列番号3の癌転移阻害融合タンパク質遺伝子を含む発現ベクターpTL2BmI-1000の作製

ヒト肝臓cDNAライブラリーよりpUC19上にクローニングしたヒト血清アルブミンcDNAを鋳型として、配列番号12および13の塩基配列で表されるプライマーを用いてPCR増幅を行ない、次いで制限酵素NcoI(宝酒造(株)製)およびHindIIIによって末端調節(部分消化)を行なった。フェノール抽出、エタノール沈殿による精製の後、アガロースゲル電気泳動し、約1800塩基対に相当するバンドを切出し、DNA-PREPを用いたガラスビーズ法で精製し、挿入断片とした。

【0037】さらにこれとは別に、シゾサッカロミセス・ボンベ発現ベクターpTL2Mを用意した。このベクターpTL2Mは、本願発明者らがすでに構築したものである(特願平5-249310号明細書)。以下にその作製方法を述べる。

【0038】[ベクターpRL2Mの作製] まず、公知の方法で調製されたpcD4CATをBamHIで切断し、CAT遺伝子を除去後ライゲーションし、pcD4を作製した。pcD4をBamHIで部分切断し、平滑末端化した後ライゲーションしてpcD4Bを作製した(特開平5-15380号公報)。

【0039】このプラスミドpcD4Bを制限酵素SacIで消化後、末端をT4DNAポリメラーゼで平滑化し、さらに制限酵素BamHIで消化した後、フェノール抽出およびエタノール沈殿によって精製した。さらにアガロースゲル電気泳動後、ガラスビーズ法によって約4500塩基対に相当するDNAを精製した。

【0040】一方、これとは別に、ヒト線維芽細胞由来の岡山-バークcDNAライブラリー(pcDベクター)を公知の方法により調製した。さらに、既に知られているヒトリポルチンIの遺伝子配列(Nature, 320, 77, (1986))のうち、タンパク質のN末端側アミノ酸配列をコードする50塩基の遺伝子配列をDNAプローブとして上述のライブラリーからリポルチンIの遺伝子をコロニーハイブリダイゼーション法により取得し、塩基配列を決定することにより、リポルチンIタンパク質全長をコードするものであることを確認した。取得したクローンをpcDlipolと名づけた。(特開平5-15380号公報)。そしてこのヒトリポルチンI

遺伝子(cDNA)を含むベクターpcDlipolを制限酵素XmnIおよびBamHIで消化した後、フェノール抽出およびエタノール沈殿によって精製した。さらにアガロースゲル電気泳動後、ガラスビーズ法によって約1300塩基対に相当するDNAを精製した。

【0041】両DNAをライゲーションした後、これを大腸菌DH5株(東洋紡(株)製)に導入して形質転換した。得られた形質転換体よりベクターを調製し、目的とするベクターpRL2L(図5)を持った形質転換体をスクリーニングした。部分塩基配列の確認および制限酵素地図の作製から目的のベクターであることを確認した。

【0042】このリポルチンI発現ベクターpRL2Lを制限酵素EcoRIおよびHindIIIで消化し、フェノール抽出、エタノール沈殿の後、アガロースゲル電気泳動により約5000塩基対に相当するバンドを切り出し、ガラスビーズ法で精製した。これとは別に、公知のプラスミドpUC19を制限酵素EcoRIおよびHindIIIで消化し、フェノール抽出、エタノール沈殿の後、ポリアクリルアミドゲル電気泳動により約60塩基対に相当するバンドを切り出し、ゲルから抽出精製した。

【0043】これら両者の断片をライゲーションの後、大腸菌DH5株を形質転換して目的とするベクターpRL2M(図6)をスクリーニングした。部分塩基配列の確認および制限酵素地図の作製から目的のベクターであることを確認した。

【0044】[ベクターpTL2Mの作製] 上記pRL2Mを鋳型とし、オリゴデオキシリボヌクレオチド 5'-TTGACTAGTTATTAATAGTA-3' およびオリゴデオキシリボヌクレオチド 5'-CTAGAATTCACATGTTGAAAAGTGCTTTATC-3'を合成プライマーとして、Taqポリメラーゼを用いたPCRによって目的断片を増幅した。制限酵素SpeIおよびEcoRIで末端調節し、フェノール抽出、エタノール沈殿の後、アガロースゲル電気泳動により約600塩基対に相当するバンドを切り出し、ガラスビーズ法で精製した。

【0045】一方、これとは別に、pRL2Mを制限酵素SpeIおよびEcoRIで消化し、フェノール抽出、エタノール沈殿の後、アガロースゲル電気泳動により約4500塩基対に相当するバンドを切り出し、ガラスビーズ法で精製した。これら両者の断片をライゲーションの後、大腸菌DH5株を形質転換して目的とするベクターpTL2M(図7)をスクリーニングした。部分塩基配列の確認および制限酵素地図の作製から目的のベクターであることを確認した。

【0046】このようにして作製したpTL2Mを制限酵素AflIIIおよびHindIIIで二重消化し、約5000塩基対に相当するバンドを切出した。

【0047】そして上記挿入断片とこの発現ベクターp

TL2Mの上記制限酵素による二重消化物との計2本を、DNAライゲーションキットを用いてライゲーションした。これを大腸菌DH5株(東洋紡(株)製)に導入して形質転換した後、目的のプラスミドpTL2Bmaを得た。アルカリ-SDS法に従ってpTL2Bmaを大量調製し、制限酵素地図の作製および塩基配列決定によって、目的の配列を持ったプラスミドであることを確認した。

【0048】さらに実施例1で作製したp12Aを鋳型として、配列番号19および20の塩基配列で表されるプライマーを用いてPCR増幅を行ない、制限酵素NcoIおよびAflIIIによって末端調節を行なった。フェノール抽出、エタノール沈澱による精製の後、アクリルアミドゲル電気泳動により約70塩基対に相当するバンドを切出し、ゲルから溶出して遺伝子断片とした。

【0049】この遺伝子断片と上記pTL2Bmaの制限酵素NcoI消化物(部分消化後、約7000塩基対に相当するバンドをDNA-PREPを用いて精製)との計2本を、DNAライゲーションキットを用いてライゲーションした。これを大腸菌DH5株に導入して形質転換した後、目的のプラスミドpTL2BmI-1000を得た。アルカリ-SDS法に従ってpTL2BmI-1000を大量調製し、制限酵素地図の作製および塩基配列決定によって、配列番号3の塩基配列を持ったプラスミドであることを確認した。

【0050】【実施例3】配列番号5の癌転移阻害融合タンパク質遺伝子を含む発現ベクターpTL2BmI-0100の作製

ヒト肝臓cDNAライブラリーよりpUC19上にクローニングしたヒト血清アルブミンcDNAを鋳型として、配列番号12および14の塩基配列で表されるプライマーを用いてPCR増幅を行ない、次いで制限酵素NcoIおよびHindIIIによって末端調節を行なった。フェノール抽出、エタノール沈澱による精製の後、アガロースゲル電気泳動し、約550塩基対に相当するバンドを切出し、DNA-PREPを用いたガラスビーズ法で精製し、挿入断片1とした。

【0051】一方、これとは別に、同じcDNAを鋳型として、配列番号15および13の塩基配列で表されるプライマーを用いてPCR増幅を行ない、次いで制限酵素HindIIIによって末端調節を行なった。フェノール抽出、エタノール沈澱による精製の後、アガロースゲル電気泳動し、約1350塩基対に相当するバンドを切出し、DNA-PREPを用いたガラスビーズ法で精製し、挿入断片2とした。

【0052】さらにこれとは別に、実施例2の場合と同様にして作製したシゾサッカロミセズ・ボンベ発現ベクターpTL2Mを用意し、このベクターpTL2Mを制限酵素AflIIIおよびHindIIIで二重消化し、約5000塩基対に相当するバンドを切出した。

【0053】そして上記挿入断片2本とこの発現ベクターpTL2Mの上記制限酵素による二重消化物との計3本を、DNAライゲーションキットを用いてライゲーションした。これを大腸菌DH5株に導入して形質転換した後、目的のプラスミドpTL2Bmbを得た。アルカリ-SDS法に従ってpTL2Bmbを大量調製し、制限酵素地図の作製および塩基配列決定によって、目的の塩基配列を持ったプラスミドであることを確認した。

【0054】さらに実施例1で作製したp12Aを鋳型として、配列番号21および22の塩基配列で表されるプライマーを用いてPCR増幅を行ない、制限酵素HindIIIによって末端調節を行なった。フェノール抽出、エタノール沈澱による精製の後、アクリルアミドゲル電気泳動により約70塩基対に相当するバンドを切出し、ゲルから溶出して遺伝子断片とした。

【0055】この遺伝子断片と上記pTL2Bmbの制限酵素HindIII消化物(部分消化後、約7000塩基対に相当するバンドをDNA-PREPを用いて精製)との計2本を、DNAライゲーションキットを用いてライゲーションした。これを大腸菌DH5株に導入して形質転換した後、目的のプラスミドpTL2BmI-0100を得た。アルカリ-SDS法に従ってpTL2BmI-0100を大量調製し、制限酵素地図の作製および塩基配列決定によって、配列番号5の塩基配列を持ったプラスミドであることを確認した。

【0056】【実施例4】配列番号7の癌転移阻害融合タンパク質遺伝子を含む発現ベクターpTL2BmI-0010の作製

ヒト肝臓cDNAライブラリーよりpUC19上にクローニングしたヒト血清アルブミンcDNAを鋳型として、配列番号12および16の塩基配列で表されるプライマーを用いてPCR増幅を行ない、次いで制限酵素NcoIおよびEcoRI(宝酒造(株)製)によって末端調節を行なった。フェノール抽出、エタノール沈澱による精製の後、アガロースゲル電気泳動し、約1100塩基対に相当するバンドを切出し、DNA-PREPを用いたガラスビーズ法で精製し、挿入断片1とした。

【0057】一方、これとは別に、同じcDNAを鋳型として、配列番号17および13の塩基配列で表されるプライマーを用いてPCR増幅を行ない、次いで制限酵素EcoRIおよびHindIIIによって末端調節を行なった。フェノール抽出、エタノール沈澱による精製の後、アガロースゲル電気泳動し、約700塩基対に相当するバンドを切出し、DNA-PREPを用いたガラスビーズ法で精製し、挿入断片2とした。

【0058】さらにこれとは別に、実施例2の場合と同様にして作製したシゾサッカロミセズ・ボンベ発現ベクターpTL2Mを用意し、このベクターpTL2Mを制限酵素AflIIIおよびHindIIIで二重消化し、約5000塩基対に相当するバンドを切出した。



【0059】そして上記挿入断片2本とこの発現ベクターpTL2Mの上記制限酵素による二重消化物との計3本を、DNAライゲーションキットを用いてライゲーションした。これを大腸菌DH5株に導入して形質転換した後、目的のプラスミドpTL2Bmcを得た。アルカリ-SDS法に従ってpTL2Bmbを大量調製し、制限酵素地図の作製および塩基配列決定によって、目的の塩基配列を持ったプラスミドであることを確認した。

【0060】さらに実施例1で作製したp12Aを鋳型として、配列番号23および24の塩基配列で表されるプライマーを用いてPCR増幅を行ない、制限酵素EcoRIによって末端調節を行なった。フェノール抽出、エタノール沈澱による精製の後、アクリルアミドゲル電気泳動により約70塩基対に相当するバンドを切出し、ゲルから溶出して遺伝子断片とした。

【0061】この遺伝子断片と上記pTL2Bmcの制限酵素EcoRI消化物との計2本を、DNAライゲーションキットを用いてライゲーションした。これを大腸菌DH5株に導入して形質転換した後、目的のプラスミドpTL2BmI-0010を得た。アルカリ-SDS法に従ってpTL2BmI-0010を大量調製し、制限酵素地図の作製および塩基配列決定によって、配列番号7の塩基配列を持ったプラスミドであることを確認した。

【0062】【実施例5】配列番号9の癌転移阻害融合タンパク質遺伝子を含む発現ベクターpTL2BmI-0001の作製

ヒト肝臓cDNAライブラリーよりpUC19上にクローニングしたヒト血清アルブミンcDNAを鋳型として、配列番号12および18の塩基配列で表されるプライマーを用いてPCR増幅を行ない、次いで制限酵素NcoIおよびAflIIIによって末端調節を行なった。フェノール抽出、エタノール沈澱による精製の後、アガロースゲル電気泳動し、約1800塩基対に相当するバンドを切出し、DNA-PREPを用いたガラスビーズ法で精製し、挿入断片とした。

【0063】一方、これとは別に、実施例2の場合と同様にして作製したシゾサッカロミセス・ボンベ発現ベクターpTL2Mを用意し、このベクターpTL2Mを制限酵素AflIIIおよびHindIIIで二重消化し、約5000塩基対に相当するバンドを切出した。

【0064】そして上記挿入断片とこの発現ベクターpTL2Mの上記制限酵素による二重消化物との計2本を、DNAライゲーションキットを用いてライゲーションした。これを大腸菌DH5株に導入して形質転換した後、目的のプラスミドpTL2Bmdを得た。アルカリ-SDS法に従ってpTL2Bmdを大量調製し、制限酵素地図の作製および塩基配列決定によって、目的の塩基配列を持ったプラスミドであることを確認した。

【0065】さらに実施例1で作製したp12Aを制限

酵素NcoIおよびHindIIIの二重消化によって末端調節を行ない、フェノール抽出、エタノール沈澱による精製の後、アクリルアミドゲル電気泳動により約70塩基対に相当するバンドを切出し、ゲルから溶出して遺伝子断片とした。

【0066】この遺伝子断片と上記pTL2Bmbの制限酵素AflIII消化物（部分消化後、約7000塩基対に相当するバンドをDNA-PREPを用いて精製）との計2本を、DNAライゲーションキットを用いてライゲーションした。これを大腸菌DH5株に導入して形質転換した後、目的のプラスミドpTL2BmI-0001を得た。アルカリ-SDS法に従ってpTL2BmI-0001を大量調製し、制限酵素地図の作製および塩基配列決定によって、配列番号9の塩基配列を持ったプラスミドであることを確認した。

【0067】ここで作製したpTL2BmI-0001を、以下単にpTL2BmIと記載する。

【0068】【実施例6】発現ベクターpTL2BmIを用いたシゾサッカロミセス・ボンベの形質転換  
シゾサッカロミセス・ボンベのロイシン要求性株、h-leu1-32 (ATCC38399)をロイシン含有最少培地MB-leuで $10^7$ 細胞数/mlになるまで生育させた。遠心集菌、水による洗菌後 $10^9$ 細胞数/mlになるように100mM酢酸リチウム(pH5.0)に懸濁し、30℃で60分間インキュベートした。その後、上記懸濁液100μlに、制限酵素PstIで消化したpAL7 (K. Okazaki et al.: Nucl. Acids Res. 18, 6485-6489 (1990)) 1μgおよび2μgの発現ベクターpTL2BmIを10μlのTEバッファーに溶かした溶液を加え、50%PEG4000を290μl加えてよく混合した後、30℃で60分間、43℃で15分間、室温で10分間の順にインキュベートした。次いで遠心分離によりPEG4000を除去した後、1mlの培養液1/2YEL-Leuに懸濁した。

【0069】この懸濁液から100μlを分取し、さらに900μlの培養液1/2YEL-Leuで希釈して、32℃30分間インキュベートした後、300μlを最少寒天培地MMAにスプレッドした。32℃で3日間インキュベートし、得られた形質転換体をG418を25μg/ml含むYEA培地に移し、さらに32℃で5日間培養し、得られたクローンを目的とする各形質転換体とした。

【0070】一方、これとは別に、癌転移阻害ペプチド遺伝子を持たないプラスミドpTL2M（既述）およびpTL2Bm（特願平5-249310号明細書）についても、同じ方法で形質転換体を作製し、ネガティブコントロールとした。なお、プラスミドpTL2Bmは以下のようにして作製した。

【0071】【プラスミドpTL2Bmの作製】国立予防衛生研究所遺伝子バンクより供与を受けた、ヒト血清

アルブミンcDNAを含むベクターpILMALB5を鋳型とし、オリゴデオキシリボヌクレオチド 5'-AGACCA TGGATGCACACACAAGAGTGAGGT-3' およびオリゴデオキシリボヌクレオチド 5'-CAGGAACAGCTATGACCAT-3' を合成プライマーとして、Taqポリメラーゼを用いたPCRによって目的断片を増幅した。制限酵素NcoIおよびHindIIIで末端調節し、フェノール抽出、エタノール沈殿の後、アガロースゲル電気泳動により約1800塩基対に相当するバンドを切り出し、ガラスビーズ法で精製した。

【0072】これとは別に、pTL2Mを制限酵素AflIIIおよびHindIIIで消化し、フェノール抽出、エタノール沈殿の後、アガロースゲル電気泳動により約5000塩基対に相当するバンドを切り出し、ガラスビーズ法で精製した。

【0073】これら両者の断片をライゲーションの後、大腸菌DH5株を形質転換して目的とするベクターpTL2Bm(図8)をスクリーニングした。部分塩基配列の確認および制限酵素地図の作製から目的のベクターであることを確認した。

【0074】【実施例7】形質転換体の培養および無細胞抽出液の調製

抗生物質G418(GIBCO BRL)を200μg/mlの濃度で含む50mlのYPD培地[(2%グルコース(和光純薬(株)製)、1%バクトイーストエキス(Difco)、2%バクトペプトン(Difco))]に、実施例6で作製した形質転換体を植菌し、32℃で5日間培養した。その培養液から10<sup>8</sup>個の菌体を集菌し、洗菌後、50mMトリス塩酸緩衝液(pH7.5)で懸濁し、超音波破碎を行った。終濃度が1%になるように10%SDS溶液を加え、80℃で15分間加熱した。遠心分離によって無細胞抽出液(上清)を得た。

【0075】これとは別に、癌転移阻害融合タンパク質遺伝子を持たない上記pTL2MおよびpTL2Bmを導入した形質転換体についても、同様の方法で無細胞抽出液を作製し、ネガティブコントロールとした。

【0076】【実施例8】SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動による癌転移阻害融合タンパク質の発現解析

SDS-PAGEによって、実施例7で作製した各形質転換体由来の無細胞抽出液について発現解析を行なった。結果を図2に示す。同図から明らかなように、pTL2BmIによる形質転換体では、コントロールであるpTL2Bmによる形質転換体に比較して、分子量69,000のバンド(同図中、\*で示す)が、癌転移阻害融合タンパク質を産生していることによって分子量71,000の位置(同図中、\*\*で示す)に移動していることが検出できた。デンストメータによって測定したところ、癌転移阻害融合タンパク質の産生量は、全菌体タンパク質の30%程度であった。

【0077】【実施例9】ウエスタンブロッティングによる癌転移阻害融合タンパク質の確認

実施例7で作製した各形質転換体由来の無細胞抽出液について実施例8と同様にしてSDS-PAGEを行なった。得られたゲルをPVDF膜(Bio-Rad)に転写し、癌転移阻害ペプチドに特異的な抗体(A. Isoai et al.: Biochem. Biophys. Res. Commun. 192, 7-14 (1993))を用いてウエスタンブロッティングを行い、ECL(アマシャム(株)製)によって検出した。結果を図3に示す。同図から明らかなように、該融合タンパク質を含む配列に相当する分子量71,000附近の位置に唯一の明瞭なバンドが得られたことから、該融合タンパク質に特異的なアミノ酸配列が含まれている融合タンパク質が産生していることが確認された。

【0078】【実施例10】癌転移阻害融合タンパク質の精製

pTL2BmIにより形質転換された形質転換体を、G418を25μg/mlの濃度で含む50mlのYPD培地で32℃、1日間前培養した後、G418を200μg/ml含む1リットルのYPD培地に1×10<sup>8</sup>/mlの割合で植菌してさらに4日間培養した。集菌後の菌体の4倍量の50mMトリス塩酸緩衝液(pH7.5)[12μMのAPMSF(和光純薬(株)製)、25μMロイペプチン(和光純薬(株)製)、2mMのEDTAを含む]に懸濁し等量のガラスビーズ(ビードビーター)を用いて0℃で破碎した。12,000rpmで20分間遠心分離した沈澱を同じ緩衝液で洗浄した後、6Mグアニジン塩酸と10mMのジチオスレイトールを含んだ50mMトリス塩酸緩衝液(pH7.5)にて50℃1時間で可溶化した後、12,000rpm、20分間遠心分離した上清を0.1MNaCl、1mMEDTA、2mM還元型グルタチオン、0.2mM酸化型グルタチオンを含んだ50mMトリス塩酸緩衝液(pH7.5)で100倍(v/v)に4℃で徐々に希釈した。1晩4℃で放置後、限外濾過膜(アミコン)にて濃縮しスーパーコース12カラムにてゲル濾過し、各画分についてSDS-PAGEにて解析し分子量71,000の位置に唯一のバンドが見られた画分を集め精製癌転移阻害融合タンパク質とした。

【0079】【実施例11】精製癌転移阻害融合タンパク質の癌細胞浸潤阻害活性の測定

実施例10で精製した癌転移阻害融合タンパク質について、癌細胞の浸潤抑制効果を調べた。評価方法はAlbiniらの方法(Albini et al.: Cancer Res. 47, 3239-3245 (1987))に従って行った。8μmのポアサイズを持つポリカーボネートフィルターを用い、上層と下層に分けられたケモタキセル(クラボウ(株)製)のフィルター上面に10μgのマトリゲル(コラポレーティブ(株)製)を塗布し、室温で一晩乾燥させた。使用直前に培養液で膨潤させ、24穴のカルチャープレートにセ

ットした。癌細胞はB16メラノーマ由来の高転移性クローンB16FE7を使用した。

【0080】細胞を $1.85 \text{ kBq/ml}$ の $[^{125} \text{ I}] \text{ IUdR}$  (アマシャム (株) 製) 存在下で2日間培養した。使用直前にトリプシン溶液で細胞を回収した後、0.1%の牛血清アルブミンを含む培養液に懸濁し細胞数と、取り込まれた $[^{125} \text{ I}] \text{ IUdR}$ の放射能を計測した。ケモタキセルの下層には $20 \mu\text{g/ml}$ のヒトフィブロネクチンを入れ、上層には $5 \times 10^4$  個の細胞を種々の濃度の癌転移阻害融合タンパク質と共に入れ、炭酸ガスインキュベータ中で20時間培養した。

【0081】培養終了後、フィルターの上面に残っている細胞を綿棒でかきとり、フィルターをティッシュソルバイザー (アマシャム (株) 製) で下面に移動した細胞と共に溶解した後、放射能を計測した。結果を図4に示す。同図から明らかなように、本癌転移阻害融合タンパク質により、癌細胞の浸潤が有意に阻害されることが示された。

【0082】なお、上記の実施例においては、ヒト血清アルブミンのC末端に癌転移阻害ペプチドを結合させた融合タンパク質を遺伝子工学的に産生せしめ、その生理活性等の確認を行っているが、ヒト血清アルブミンのN\*

## 配列

Ala Glu Asp Gly Asp Ala Lys Thr Asp Gln Ala Glu Lys Ala Glu Gly  
1 5 10 15  
Ala Gly Asp Ala Lys  
20 21

配列番号: 2

配列の長さ: 608

配列の型: アミノ酸

## 配列

Met Ala Glu Asp Gly Asp Ala Lys Thr Asp Gln Ala Glu Lys Ala Glu  
1 5 10 15  
Gly Ala Gly Asp Ser Lys Ala Asp Ala His Lys Ser Glu Val Ala His  
20 25 30  
Arg Phe Lys Asp Leu Gly Glu Glu Asn Phe Lys Ala Leu Val Leu Ile  
35 40 45  
Ala Phe Ala Gln Tyr Leu Gln Gln Cys Pro Phe Glu Asp His Val Lys  
50 55 60  
Leu Val Asn Glu Val Thr Glu Phe Ala Lys Thr Cys Val Ala Asp Glu  
65 70 75 80  
Ser Ala Glu Asn Cys Asp Lys Ser Leu His Thr Leu Phe Gly Asp Lys  
85 90 95  
Leu Cys Thr Val Ala Thr Leu Arg Glu Thr Tyr Gly Glu Met Ala Asp  
100 105 110  
Cys Cys Ala Lys Gln Glu Pro Glu Arg Asn Glu Cys Phe Leu Gln His  
115 120 125  
Lys Asp Asp Asn Pro Asn Leu Pro Arg Leu Val Arg Pro Glu Val Asp  
130 135 140  
Val Met Cys Thr Ala Phe His Asp Asn Glu Glu Thr Phe Leu Lys Lys

\*末端、第1~2ドメイン間、第2~3ドメイン間に癌転移阻害ペプチドを結合させた場合においても、上記と同様な効果が得られると考えられる。

## 【0083】

【発明の効果】以上詳述したように本発明によれば、これまで化学的合成方法および結合方法を組合わせてのみ作製可能であった癌転移阻害融合タンパク質を組換えDNA技術を用いることによって初めて直接的に、しかも高効率に生産することができるという効果が奏される。

【0084】したがって、本発明における形質転換体を用いた大量培養により、目的とする癌転移阻害融合タンパク質の高い生産性が得られ、工業スケールでの生産に使用することが十分可能である。すなわち医薬品としての癌転移阻害融合タンパク質を安定的に供給することが可能になったといえる。

## 【0085】

## 【配列表】

配列番号: 1

配列の長さ: 21

配列の型: アミノ酸

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: ペプチド

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: タンパク質

30

19	20
145	150
Tyr Leu Tyr Glu Ile Ala Arg Arg His Pro Tyr Phe Tyr Ala Pro Glu	155
165	170
Leu Leu Phe Phe Ala Lys Arg Tyr Lys Ala Ala Phe Thr Glu Cys Cys	175
180	185
Gln Ala Ala Asp Lys Ala Ala Cys Leu Leu Pro Lys Leu Asp Glu Leu	190
195	200
Arg Asp Glu Gly Lys Ala Ser Ser Ala Lys Gln Arg Leu Lys Cys Ala	205
210	215
Ser Leu Gln Lys Phe Gly Glu Arg Ala Phe Lys Ala Trp Ala Val Ala	220
225	230
Arg Leu Ser Gln Arg Phe Pro Lys Ala Glu Phe Ala Glu Val Ser Lys	235
245	250
Leu Val Thr Asp Leu Thr Lys Val His Thr Glu Cys Cys His Gly Asp	255
260	265
Leu Leu Glu Cys Ala Asp Asp Arg Ala Asp Leu Ala Lys Tyr Ile Cys	270
275	280
Glu Asn Gln Asp Ser Ile Ser Ser Lys Leu Lys Glu Cys Cys Glu Lys	285
290	295
Pro Leu Leu Glu Lys Ser His Cys Ile Ala Glu Val Glu Asn Asp Glu	300
305	310
Met Pro Ala Asp Leu Pro Ser Leu Ala Ala Asp Phe Val Glu Ser Lys	315
325	330
Asp Val Cys Lys Asn Tyr Ala Glu Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly Met	335
340	345
Phe Leu Tyr Glu Tyr Ala Arg Arg His Pro Asp Tyr Ser Val Val Leu	350
355	360
Leu Leu Arg Leu Ala Lys Thr Tyr Glu Thr Thr Leu Glu Lys Cys Cys	365
370	375
Ala Ala Ala Asp Pro His Glu Cys Tyr Ala Lys Val Phe Asp Glu Phe	380
385	390
Lys Pro Leu Val Glu Glu Pro Gln Asn Leu Ile Lys Gln Asn Cys Glu	395
405	410
Leu Phe Lys Gln Leu Gly Glu Tyr Lys Phe Gln Asn Ala Leu Leu Val	415
420	425
Arg Tyr Thr Lys Lys Val Pro Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val Glu	430
435	440
Val Ser Arg Asn Leu Gly Lys Val Gly Ser Lys Cys Cys Lys His Pro	445
450	455
Glu Ala Lys Arg Met Pro Cys Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val Leu	460
465	470
Asn Gln Leu Cys Val Leu His Glu Lys Thr Pro Val Ser Asp Arg Val	475
485	490
Thr Lys Cys Cys Thr Glu Ser Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe Ser	495
500	505
Ala Leu Glu Val Asp Glu Thr Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala Glu	510
515	520
Thr Phe Thr Phe His Ala Asp Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu Arg	525
530	535
Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala Leu Val Glu Leu Val Lys His Lys Pro	540

21 22

545 550 555 560

Lys Ala Thr Lys Glu Leu Lys Ala Val Met Asp Asp Phe Ala Ala

565 570 575

Phe Val Glu Lys Cys Cys Lys Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe Ala

580 585 590

Glu Glu Gly Lys Lys Leu Val Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly Leu

595 600 605 608

配列番号：3

配列の長さ：1830

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA to mRNA

配列の特徴：

10 特徴を表す記号：CDS

存在位置：1..1830

特徴を決定した方法：E

## 配列

ATG GCC GAG GAC GGT GAC GCC AAG ACC GAC CAA GCT GAG AAG GCT GAG 48

GGT GCC GGT GAC GCC AAG GCC ATG GAT GCA CAC AAG AGT GAG GTT GCT 96

CAT CGG TTT AAA GAT TTG GGA GAA GAA AAT TTC AAA GCC TTG GTG TTG 144

ATT GCC TTT GCT CAG TAT CTT CAG CAG TGT CCA TTT GAA GAT CAT GTA 192

AAA TTA GTG AAT GAA GTA ACT GAA TTT GCA AAA ACA TGT GTA GCT GAT 240

GAG TCA GCT GAA AAT TGT GAC AAA TCA CTT CAT ACC CTT TTT GGA GAC 288

AAA TTA TGC ACA GTT GCA ACT CTT CGT GAA ACC TAT GGT GAA ATG GCT 336

GAC TGC TGT GCA AAA CAA GAA CCT GAG AGA AAT GAA TGC TTC TTG CAA 384

CAC AAA GAT GAC AAC CCA AAC CTC CCC CGA TTG GTG AGA CCA GAG GTT 432

GAT GTG ATG TGC ACT GCT TTT CAT GAC AAT GAA GAG ACA TTT TTG AAA 480

AAA TAC TTA TAT GAA ATT GCC AGA AGA CAT CCT TAC TTT TAT GCC CCG 528

GAA CTC CTT TTC TTT GCT AAA AGG TAT AAA GCT GCT TTT ACA GAA TGT 576

TGC CAA GCT GCT GAT AAA GCT GCC TGC CTG TTG CCA AAG CTC GAT GAA 624

CTT CGG GAT GAA GGG AAG GCT TCG TCT GCC AAA CAG AGA CTC AAA TGT 672

GCC AGT CTC CAA AAA TTT GGA GAA AGA GCT TTC AAA GCA TGG GCA GTG 720

GCT CGC CTG AGC CAG AGA TTT CCC AAA GCT GAG TTT GCA GAA GTT TCC 768

AAG TTA GTG ACA GAT CTT ACC AAA GTC CAC ACG GAA TGC TGC CAT GGA 816

GAT CTG CTT GAA TGT GCT GAT GAC AGG GCG GAC CTT GCC AAG TAT ATC 864

TGT GAA AAT CAG GAT TCG ATC TCC AGT AAA CTG AAG GAA TGC TGT GAA 912

AAA CCT CTG TTG GAA AAA TCC CAC TGC ATT GCC GAA GTG GAA AAT GAT 960

GAG ATG CCT GCT GAC TTG CCT TCA TTA GCT GCT GAT TTT GTT GAA AGT 1008

AAG GAT GTT TGC AAA AAC TAT GCT GAG GCA AAG GAT GTC TTC CTG GGC 1056

ATG TTT TTG TAT GAA TAT GCA AGA AGG CAT CCT GAT TAC TCT GTC GTG 1104

CTG CTG CTG AGA CTT GCC AAG ACA TAT GAA ACC ACT CTA GAG AAG TGC 1152

TGT GCC GCT GCA GAT CCT CAT GAA TGC TAT GCC AAA GTG TTC GAT GAA 1200

TTT AAA CCT CTT GTG GAA GAG CCT CAG AAT TTA ATC AAA CAA AAC TGT 1248

GAG CTT TTT AAG CAG CTT GGA GAG TAC AAA TTC CAG AAT GCG CTA TTA 1296

GTT CGT TAC ACC AAG AAA GTA CCC CAA GTG TCA ACT CCA ACT CTT GTA 1344

GAG GTC TCA AGA AAC CTA GGA AAA GTG GGC AGC AAA TGT TGT AAA CAT 1392

CCT GAA GCA AAA AGA ATG CCC TGT GCA GAA GAC TAT CTA TCC GTG GTC 1440

CTG AAC CAG TTA TGT GTG TTG CAT GAG AAA ACG CCA GTA AGT GAC AGA 1488

GTC ACA AAA TGC TGC ACA GAG TCC TTG GTG AAC AGG CGA CCA TGC TTT 1536

TCA GCT CTG GAA GTC GAT GAA ACA TAC GTT CCC AAA GAG TTT AAT GCT 1584

GAA ACA TTC ACC TTC CAT GCA GAT ATA TGC ACA CTT TCT GAG AAG GAG 1632

AGA CAA ATC AAG AAA CAA ACT GCA CTT GTT GAG CTC GTG AAA CAC AAG 1680

CCC AAG GCA ACA AAA GAG CAA CTG AAA GCT GTT ATG GAT GAT TTC GCA 1728

GCT TTT GTA GAG AAG TGC TGC AAG GCT GAC GAT AAG GAG ACC TGC TTT 1776

23

24

GCC GAG GAG GGT AAA AAA CTT GTT GCT GCA AGT CAA GCT GCC TTA GGC 1824  
TTA TAA 1830

配列番号: 4

配列の長さ: 631

配列の型: アミノ酸

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: タンパク質

## 配列

Met Asp Ala His Lys Ser Glu Val Ala His Arg Phe Lys Asp Leu Gly  
1 5 10 15  
Glu Glu Asn Phe Lys Ala Leu Val Leu Ile Ala Phe Ala Gln Tyr Leu  
20 25 30  
Gln Gln Cys Pro Phe Glu Asp His Val Lys Leu Val Asn Glu Val Thr  
35 40 45  
Glu Phe Ala Lys Thr Cys Val Ala Asp Glu Ser Ala Glu Asn Cys Asp  
50 55 60  
Lys Ser Leu His Thr Leu Phe Gly Asp Lys Leu Cys Thr Val Ala Thr  
65 70 75 80  
Leu Arg Glu Thr Tyr Gly Glu Met Ala Asp Cys Cys Ala Lys Gln Glu  
85 90 95  
Pro Glu Arg Asn Glu Cys Phe Leu Gln His Lys Asp Asp Asn Pro Asn  
100 105 110  
Leu Pro Arg Leu Val Arg Pro Glu Val Asp Val Met Cys Thr Ala Phe  
115 120 125  
His Asp Asn Glu Glu Thr Phe Leu Lys Lys Tyr Leu Tyr Glu Ile Ala  
130 135 140  
Arg Arg His Pro Tyr Phe Tyr Ala Pro Glu Leu Leu Phe Phe Ala Lys  
145 150 155 160  
Arg Tyr Lys Ala Ala Phe Thr Glu Cys Cys Gln Ala Ala Asp Lys Ala  
165 170 175  
Ala Cys Leu Leu Pro Lys Leu Ala Glu Asp Gly Asp Ala Lys Thr Asp  
180 185 190  
Gln Ala Glu Lys Ala Glu Gly Ala Gly Asp Ala Lys Leu Asp Glu Leu  
195 200 205  
Arg Asp Glu Gly Lys Ala Ser Ser Ala Lys Gln Arg Leu Lys Cys Ala  
210 215 220  
Ser Leu Gln Lys Phe Gly Glu Arg Ala Phe Lys Ala Trp Ala Val Ala  
225 230 235 240  
Arg Leu Ser Gln Arg Phe Pro Lys Ala Glu Phe Ala Glu Val Ser Lys  
245 250 255  
Leu Val Thr Asp Leu Thr Lys Val His Thr Glu Cys Cys His Gly Asp  
260 265 270  
Leu Leu Glu Cys Ala Asp Asp Arg Ala Asp Leu Ala Lys Tyr Ile Cys  
275 280 285  
Glu Asn Gln Asp Ser Ile Ser Ser Lys Leu Lys Glu Cys Cys Glu Lys  
290 295 300  
Pro Leu Leu Glu Lys Ser His Cys Ile Ala Glu Val Glu Asn Asp Glu  
305 310 315 320  
Met Pro Ala Asp Leu Pro Ser Leu Ala Ala Asp Phe Val Glu Ser Lys  
325 330 335  
Asp Val Cys Lys Asn Tyr Ala Glu Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly Met  
340 345 350

25  
 Phe Leu Tyr Glu Tyr Ala Arg Arg His Pro Asp Tyr Ser Val Val Leu  
 355 360 365  
 Leu Leu Arg Leu Ala Lys Thr Tyr Glu Thr Thr Leu Glu Lys Cys Cys  
 370 375 380  
 Ala Ala Ala Asp Pro His Glu Cys Tyr Ala Lys Val Phe Asp Glu Phe  
 385 390 395 400  
 Lys Pro Leu Val Glu Glu Pro Gln Asn Leu Ile Lys Gln Asn Cys Glu  
 405 410 415  
 Leu Phe Lys Gln Leu Gly Glu Tyr Lys Phe Gln Asn Ala Leu Leu Val  
 420 425 430  
 Arg Tyr Thr Lys Lys Val Pro Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val Glu  
 435 440 445  
 Val Ser Arg Asn Leu Gly Lys Val Gly Ser Lys Cys Cys Lys His Pro  
 450 455 460  
 Glu Ala Lys Arg Met Pro Cys Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val Leu  
 465 470 475 480  
 Asn Gln Leu Cys Val Leu His Glu Lys Thr Pro Val Ser Asp Arg Val  
 485 490 495  
 Thr Lys Cys Cys Thr Glu Ser Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe Ser  
 500 505 510  
 Ala Leu Glu Val Asp Glu Thr Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala Glu  
 515 520 525  
 Thr Phe Thr Phe His Ala Asp Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu Arg  
 530 535 540  
 Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala Leu Val Glu Leu Val Lys His Lys Pro  
 545 550 555 560  
 Lys Ala Thr Lys Glu Gln Leu Lys Ala Val Met Asp Asp Phe Ala Ala  
 565 570 575  
 Phe Val Glu Lys Cys Cys Lys Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe Ala  
 580 585 590  
 Glu Glu Gly Lys Lys Leu Val Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly Leu  
 595 600 605  
 Tyr Met Ala Glu Asp Gly Asp Ala Lys Thr Asp Gln Ala Glu Lys Ala  
 610 615 620  
 Glu Gly Ala Gly Asp Ala Lys  
 625 630 631

配列番号: 5

配列の長さ: 1827

配列の型: 核酸

鎖の数: 二本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: cDNA to mRNA

配列の特徴

特徴を表す記号: CDS

40 存在位置: 1..1827

特徴を決定した方法: E

配列

ATG GAT GCA CAC AAG AGT GAG GTT GCT CAT CGG TTT AAA GAT TTG GGA	48
GAA GAA AAT TTC AAA GCC TTG GTG TTG ATT GCC TTT GCT CAG TAT CTT	96
CAG CAG TGT CCA TTT GAA GAT CAT GTA AAA TTA GTG AAT GAA GTA ACT	144
GAA TTT GCA AAA ACA TGT GTA GCT GAT GAG TCA GCT GAA AAT TGT GAC	192
AAA TCA CTT CAT ACC CTT TTT GGA GAC AAA TTA TGC ACA GTT GCA ACT	240
CTT CGT GAA ACC TAT GGT GAA ATG GCT GAC TGC TGT GCA AAA CAA GAA	288
CCT GAG AGA AAT GAA TGC TTC TTG CAA CAC AAA GAT GAC AAC CCA AAC	336
CTC CCC CGA TTG GTG AGA CCA GAG GTT GAT GTG ATG TGC ACT GCT TTT	384

27	28
CAT GAC AAT GAA GAG ACA TTT TTG AAA AAA TAC TTA TAT GAA ATT GCC	432
AGA AGA CAT CCT TAC TTT TAT GCC CCG GAA CTC CTT TTC TTT GCT AAA	480
AGG TAT AAA GCT GCT TTT ACA GAA TGT TGC CAA GCT GCT GAT AAA GCT	528
GCC TGC CTG TTG CCA AAG CTT GCC GAG GAC GGT GAC GCC AAG ACC GAC	576
CAA GCT GAG AAG GCT GAG GGT GCC GGT GAC GCC AAG CTT GAT GAA CTT	624
CGG GAT GAA GGG AAG GCT TCG TCT GCC AAA CAG AGA CTC AAA TGT GCC	672
AGT CTC CAA AAA TTT GGA GAA AGA GCT TTC AAA GCA TGG GCA GTG GCT	720
CGC CTG AGC CAG AGA TTT CCC AAA GCT GAG TTT GCA GAA GTT TCC AAG	768
TTA GTG ACA GAT CTT ACC AAA GTC CAC ACG GAA TGC TGC CAT GGA GAT	816
CTG CTT GAA TGT GCT GAT GAC AGG GCG GAC CTT GCC AAG TAT ATC TGT	864
GAA AAT CAG GAT TCG ATC TCC AGT AAA CTG AAG GAA TGC TGT GAA AAA	912
CCT CTG TTG GAA AAA TCC CAC TGC ATT GCC GAA GTG GAA AAT GAT GAG	960
ATG CCT GCT GAC TTG CCT TCA TTA GCT GCT GAT TTT GTT GAA AGT AAG	1008
GAT GTT TGC AAA AAC TAT GCT GAG GCA AAG GAT GTC TTC CTG GGC ATG	1056
TTT TTG TAT GAA TAT GCA AGA AGG CAT CCT GAT TAC TCT GTC GTG CTG	1104
CTG CTG AGA CTT GCC AAG ACA TAT GAA ACC ACT CTA GAG AAG TGC TGT	1152
GCC GCT GCA GAT CCT CAT GAA TGC TAT GCC AAA GTG TTC GAT GAA TTT	1200
AAA CCT CTT GTG GAA GAG CCT CAG AAT TTA ATC AAA CAA AAC TGT GAG	1248
CTT TTT AAG CAG CTT GGA GAG TAC AAA TTC CAG AAT GCG CTA TTA GTT	1296
CGT TAC ACC AAG AAA GTA CCC CAA GTG TCA ACT CCA ACT CTT GTA GAG	1344
GTC TCA AGA AAC CTA GGA AAA GTG GGC AGC AAA TGT TGT AAA CAT CCT	1392
GAA GCA AAA AGA ATG CCC TGT GCA GAA GAC TAT CTA TCC GTG GTC CTG	1440
AAC CAG TTA TGT GTG TTG CAT GAG AAA ACG CCA GTA AGT GAC AGA GTC	1488
ACA AAA TGC TGC ACA GAG TCC TTG GTG AAC AGG CGA CCA TGC TTT TCA	1536
GCT CTG GAA GTC GAT GAA ACA TAC GTT CCC AAA GAG TTT AAT GCT GAA	1584
ACA TTC ACC TTC CAT GCA GAT ATA TGC ACA CTT TCT GAG AAG GAG AGA	1632
CAA ATC AAG AAA CAA ACT GCA CTT GTT GAG CTC GTG AAA CAC AAG CCC	1680
AAG GCA ACA AAA GAG CAA CTG AAA GCT GTT ATG GAT GAT TTC GCA GCT	1728
TTT GTA GAG AAG TGC TGC AAG GCT GAC GAT AAG GAG ACC TGC TTT GCC	1776
GAG GAG GGT AAA AAA CTT GTT GCT GCA AGT CAA GCT GCC TTA GGC TTA	1824
TAA	1827

配列番号: 6

配列の長さ: 632

配列の型: アミノ酸

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: タンパク質

## 配列

Met Asp Ala His Lys Ser Glu Val Ala His Arg Phe Lys Asp Leu Gly  
 1 5 10 15  
 Glu Glu Asn Phe Lys Ala Leu Val Leu Ile Ala Phe Ala Gln Tyr Leu  
 20 25 30  
 Gln Gln Cys Pro Phe Glu Asp His Val Lys Leu Val Asn Glu Val Thr  
 35 40 45  
 Glu Phe Ala Lys Thr Cys Val Ala Asp Glu Ser Ala Glu Asn Cys Asp  
 50 55 60  
 Lys Ser Leu His Thr Leu Phe Gly Asp Lys Leu Cys Thr Val Ala Thr  
 65 70 75 80  
 Leu Arg Glu Thr Tyr Gly Glu Met Ala Asp Cys Cys Ala Lys Gln Glu  
 85 90 95  
 Pro Glu Arg Asn Glu Cys Phe Leu Gln His Lys Asp Asp Asn Pro Asn  
 100 105 110  
 Leu Pro Arg Leu Val Arg Pro Glu Val Asp Val Met Cys Thr Ala Phe



29 115 120 125 30  
 His Asp Asn Glu Glu Thr Phe Leu Lys Lys Tyr Leu Tyr Glu Ile Ala  
 130 135 140  
 Arg Arg His Pro Tyr Phe Tyr Ala Pro Glu Leu Leu Phe Phe Ala Lys  
 145 150 155 160  
 Arg Tyr Lys Ala Ala Phe Thr Glu Cys Cys Gln Ala Ala Asp Lys Ala  
 165 170 175  
 Ala Cys Leu Leu Pro Lys Leu Asp Glu Leu Arg Asp Glu Gly Lys Ala  
 180 185 190  
 Ser Ser Ala Lys Gln Arg Leu Lys Cys Ala Ser Leu Gln Lys Phe Gly  
 195 200 205  
 Glu Arg Ala Phe Lys Ala Trp Ala Val Ala Arg Leu Ser Gln Arg Phe  
 210 215 220  
 Pro Lys Ala Glu Phe Ala Glu Val Ser Lys Leu Val Thr Asp Leu Thr  
 225 230 235 240  
 Lys Val His Thr Glu Cys Cys His Gly Asp Leu Leu Glu Cys Ala Asp  
 245 250 255  
 Asp Arg Ala Asp Leu Ala Lys Tyr Ile Cys Glu Asn Gln Asp Ser Ile  
 260 265 270  
 Ser Ser Lys Leu Lys Glu Cys Cys Glu Lys Pro Leu Leu Glu Lys Ser  
 275 280 285  
 His Cys Ile Ala Glu Val Glu Asn Asp Glu Met Pro Ala Asp Leu Pro  
 290 295 300  
 Ser Leu Ala Ala Asp Phe Val Glu Ser Lys Asp Val Cys Lys Asn Tyr  
 305 310 315 320  
 Ala Glu Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly Met Phe Leu Tyr Glu Tyr Ala  
 325 330 335  
 Arg Arg His Pro Asp Tyr Ser Val Val Leu Leu Leu Arg Leu Ala Lys  
 340 345 350  
 Thr Tyr Glu Thr Thr Leu Glu Lys Cys Cys Ala Ala Ala Asp Pro His  
 355 360 365  
 Glu Cys Tyr Ala Lys Val Phe Asp Glu Phe Ala Glu Asp Gly Asp Ala  
 370 375 380  
 Lys Thr Asp Gln Ala Glu Lys Ala Glu Gly Ala Gly Asp Ala Lys Glu  
 385 390 395 400  
 Phe Lys Pro Leu Val Glu Glu Pro Gln Asn Leu Ile Lys Gln Asn Cys  
 405 410 415  
 Glu Leu Phe Lys Gln Leu Gly Glu Tyr Lys Phe Gln Asn Ala Leu Leu  
 420 425 430  
 Val Arg Tyr Thr Lys Lys Val Pro Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val  
 435 440 445  
 Glu Val Ser Arg Asn Leu Gly Lys Val Gly Ser Lys Cys Cys Lys His  
 450 455 460  
 Pro Glu Ala Lys Arg Met Pro Cys Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val  
 465 470 475 480  
 Leu Asn Gln Leu Cys Val Leu His Glu Lys Thr Pro Val Ser Asp Arg  
 485 490 495  
 Val Thr Lys Cys Cys Thr Glu Ser Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe  
 500 505 510  
 Ser Ala Leu Glu Val Asp Glu Thr Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala

31 32

515 520 525

Glu Thr Phe Thr Phe His Ala Asp Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu

530 535 540

Arg Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala Leu Val Glu Leu Val Lys His Lys

545 550 555 560

Pro Lys Ala Thr Lys Glu Gln Leu Lys Ala Val Met Asp Asp Phe Ala

565 570 575

Ala Phe Val Glu Lys Cys Cys Lys Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe

580 585 590

Ala Glu Glu Gly Lys Lys Leu Val Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly

595 600 605

Leu Tyr Met Ala Glu Asp Gly Asp Ala Lys Thr Asp Gln Ala Glu Lys

610 615 620

Ala Glu Gly Ala Gly Asp Ala Lys

625 630 632

配列番号: 7

配列の長さ: 1830

配列の型: 核酸

鎖の数: 二本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: cDNA to mRNA

配列の特徴

特徴を表す記号: CDS

存在位置: 1..1830

20 特徴を決定した方法: E

## 配列

ATG GAT GCA CAC AAG AGT GAG GTT GCT CAT CGG TTT AAA GAT TTG GGA 48

GAA GAA AAT TTC AAA GCC TTG GTG TTG ATT GCC TTT GCT CAG TAT CTT 96

CAG CAG TGT CCA TTT GAA GAT CAT GTA AAA TTA GTG AAT GAA GTA ACT 144

GAA TTT GCA AAA ACA TGT GTA GCT GAT GAG TCA GCT GAA AAT TGT GAC 192

AAA TCA CTT CAT ACC CTT TTT GGA GAC AAA TTA TGC ACA GTT GCA ACT 240

CTT CGT GAA ACC TAT GGT GAA ATG GCT GAC TGC TGT GCA AAA CAA GAA 288

CCT GAG AGA AAT GAA TGC TTC TTG CAA CAC AAA GAT GAC AAC CCA AAC 336

CTC CCC CGA TTG GTG AGA CCA GAG GTT GAT GTG ATG TGC ACT GCT TTT 384

CAT GAC AAT GAA GAG ACA TTT TTG AAA AAA TAC TTA TAT GAA ATT GCC 432

AGA AGA CAT CCT TAC TTT TAT GCC CCG GAA CTC CTT TTC TTT GCT AAA 480

AGG TAT AAA GCT GCT TTT ACA GAA TGT TGC CAA GCT GCT GAT AAA GCT 528

GCC TGC CTG TTG CCA AAG CTC GAT GAA CTT CGG GAT GAA GGG AAG GCT 576

TCG TCT GCC AAA CAG AGA CTC AAA TGT GCC AGT CTC CAA AAA TTT GGA 624

GAA AGA GCT TTC AAA GCA TGG GCA GTG GCT CGC CTG AGC CAG AGA TTT 672

CCC AAA GCT GAG TTT GCA GAA GTT TCC AAG TTA GTG ACA GAT CTT ACC 720

AAA GTC CAC ACG GAA TGC TGC CAT GGA GAT CTG CTT GAA TGT GCT GAT 768

GAC AGG GCG GAC CTT GCC AAG TAT ATC TGT GAA AAT CAG GAT TCG ATC 816

TCC AGT AAA CTG AAG GAA TGC TGT GAA AAA CCT CTG TTG GAA AAA TCC 864

CAC TGC ATT GCC GAA GTG GAA AAT GAT GAG ATG CCT GCT GAC TTG CCT 912

TCA TTA GCT GCT GAT TTT GTT GAA AGT AAG GAT GTT TGC AAA AAC TAT 960

GCT GAG GCA AAG GAT GTC TTC CTG GGC ATG TTT TTG TAT GAA TAT GCA 1008

AGA AGG CAT CCT GAT TAC TCT GTC GTG CTG CTG CTG AGA CTT GCC AAG 1056

ACA TAT GAA ACC ACT CTA GAG AAG TGC TGT GCC GCT GCA GAT CCT CAT 1104

GAA TGC TAT GCC AAA GTG TTC GAT GAA TTC GCC GAG GAC GGT GAC GCC 1152

AAG ACC GAC CAA GCT GAG AAG GCT GAG GGT GCC GGT GAC GCC AAG GAA 1200

TTC AAA CCT CTT GTG GAA GAG CCT CAG AAT TTA ATC AAA CAA AAC TGT 1248

GAG CTT TTT AAG CAG CTT GGA GAG TAC AAA TTC CAG AAT GCG CTA TTA 1296

GTT CGT TAC ACC AAG AAA GTA CCC CAA GTG TCA ACT CCA ACT CTT GTA 1344

GAG GTC TCA AGA AAC CTA GGA AAA GTG GGC AGC AAA TGT TGT AAA CAT 1392

33

34

トポロジー：直鎖状

配列の種類：タンパク質

配列の型：アミノ酸

Met	Asp	Ala	His	Lys	Ser	Glu	Val	Ala	His	Arg	Phe	Lys	Asp	Leu	Gly
1				5					10					15	
Glu	Glu	Asn	Phe	Lys	Ala	Leu	Val	Leu	Ile	Ala	Phe	Ala	Gln	Tyr	Leu
			20					25					30		
Gln	Gln	Cys	Pro	Phe	Glu	Asp	His	Val	Lys	Leu	Val	Asn	Glu	Val	Thr
			35				40					45			
Glu	Phe	Ala	Lys	Thr	Cys	Val	Ala	Asp	Glu	Ser	Ala	Glu	Asn	Cys	Asp
			50				55				60				
Lys	Ser	Leu	His	Thr	Leu	Phe	Gly	Asp	Lys	Leu	Cys	Thr	Val	Ala	Thr
65					70					75				80	
Leu	Arg	Glu	Thr	Tyr	Gly	Glu	Met	Ala	Asp	Cys	Cys	Ala	Lys	Gln	Glu
				85					90					95	
Pro	Glu	Arg	Asn	Glu	Cys	Phe	Leu	Gln	His	Lys	Asp	Asp	Asn	Pro	Asn
			100						105				110		
Leu	Pro	Arg	Leu	Val	Arg	Pro	Glu	Val	Asp	Val	Met	Cys	Thr	Ala	Phe
			115					120				125			
His	Asp	Asn	Glu	Glu	Thr	Phe	Leu	Lys	Lys	Tyr	Leu	Tyr	Glu	Ile	Ala
			130				135					140			
Arg	Arg	His	Pro	Tyr	Phe	Tyr	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Phe	Phe	Ala	Lys
145					150					155				160	
Arg	Tyr	Lys	Ala	Ala	Phe	Thr	Glu	Cys	Cys	Gln	Ala	Ala	Asp	Lys	Ala
				165					170					175	
Ala	Cys	Leu	Leu	Pro	Lys	Leu	Asp	Glu	Leu	Arg	Asp	Glu	Gly	Lys	Ala
			180					185					190		
Ser	Ser	Ala	Lys	Gln	Arg	Leu	Lys	Cys	Ala	Ser	Leu	Gln	Lys	Phe	Gly
			195				200					205			
Glu	Arg	Ala	Phe	Lys	Ala	Trp	Ala	Val	Ala	Arg	Leu	Ser	Gln	Arg	Phe
			210			215				220					
Pro	Lys	Ala	Glu	Phe	Ala	Glu	Val	Ser	Lys	Leu	Val	Thr	Asp	Leu	Thr
225					230					235				240	
Lys	Val	His	Thr	Glu	Cys	Cys	His	Gly	Asp	Leu	Leu	Glu	Cys	Ala	Asp
				245					250				255		
Asp	Arg	Ala	Asp	Leu	Ala	Lys	Tyr	Ile	Cys	Glu	Asn	Gln	Asp	Ser	Ile
			260					265				270			
Ser	Ser	Lys	Leu	Lys	Glu	Cys	Cys	Glu	Lys	Pro	Leu	Leu	Glu	Lys	Ser
			275				280					285			

35 36  
 His Cys Ile Ala Glu Val Glu Asn Asp Glu Met Pro Ala Asp Leu Pro  
 290 295 300  
 Ser Leu Ala Ala Asp Phe Val Glu Ser Lys Asp Val Cys Lys Asn Tyr  
 305 310 315 320  
 Ala Glu Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly Met Phe Leu Tyr Glu Tyr Ala  
 325 330 335  
 Arg Arg His Pro Asp Tyr Ser Val Val Leu Leu Leu Arg Leu Ala Lys  
 340 345 350  
 Thr Tyr Glu Thr Thr Leu Glu Lys Cys Cys Ala Ala Ala Asp Pro His  
 355 360 365  
 Glu Cys Tyr Ala Lys Val Phe Asp Glu Phe Lys Pro Leu Val Glu Glu  
 370 375 380  
 Pro Gln Asn Leu Ile Lys Gln Asn Cys Glu Leu Phe Lys Gln Leu Gly  
 385 390 395 400  
 Glu Tyr Lys Phe Gln Asn Ala Leu Leu Val Arg Tyr Thr Lys Lys Val  
 405 410 415  
 Pro Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val Glu Val Ser Arg Asn Leu Gly  
 420 425 430  
 Lys Val Gly Ser Lys Cys Cys Lys His Pro Glu Ala Lys Arg Met Pro  
 Cys Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val Leu Asn Gln Leu Cys Val Leu  
 450 455 460  
 His Glu Lys Thr Pro Val Ser Asp Arg Val Thr Lys Cys Cys Thr Glu  
 465 470 475 480  
 Ser Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe Ser Ala Leu Glu Val Asp Glu  
 485 490 495  
 Thr Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala Glu Thr Phe Thr Phe His Ala  
 500 505 510  
 Asp Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu Arg Gln Ile Lys Lys Gln Thr  
 515 520 525  
 Ala Leu Val Glu Leu Val Lys His Lys Pro Lys Ala Thr Lys Glu Gln  
 530 535 540  
 Leu Lys Ala Val Met Asp Asp Phe Ala Ala Phe Val Glu Lys Cys Cys  
 545 550 555 560  
 Lys Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe Ala Glu Glu Gly Lys Lys Leu  
 565 570 575  
 Val Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly Leu Tyr Met Ala Glu Asp Gly  
 580 585 590  
 Asp Ala Lys Thr Asp Gln Ala Glu Lys Ala Glu Gly Ala Gly Asp Ala  
 595 600 605  
 Lys  
 609

配列番号：9

配列の長さ：1830

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA to mRNA

配列の特徴

特徴を表す記号：CDS

存在位置：1..1830

特徴を決定した方法：E

配列

ATG GAT GCA CAC AAG AGT GAG GTT GCT CAT CGG TTT AAA GAT TTG GGA 48  
 GAA GAA AAT TTC AAA GCC TTG GTG TTG ATT GCC TTT GCT CAG TAT CTT 96  
 CAG CAG TGT CCA TTT GAA GAT CAT GTA AAA TTA GTG AAT GAA GTA ACT 144

37

38

GAA TTT GCA AAA ACA TGT GTA GCT GAT GAG TCA GCT GAA AAT TGT GAC 192  
 AAA TCA CTT CAT ACC CTT TTT GGA GAC AAA TTA TGC ACA GTT GCA ACT 240  
 CTT CGT GAA ACC TAT GGT GAA ATG GCT GAC TGC TGT GCA AAA CAA GAA 288  
 CCT GAG AGA AAT GAA TGC TTC TTG CAA CAC AAA GAT GAC AAC CCA AAC 336  
 CTC CCC CGA TTG GTG AGA CCA GAG GTT GAT GTG ATG TGC ACT GCT TTT 384  
 CAT GAC AAT GAA GAG ACA TTT TTG AAA AAA TAC TTA TAT GAA ATT GCC 432  
 AGA AGA CAT CCT TAC TTT TAT GCC CCG GAA CTC CTT TTC TTT GCT AAA 480  
 AGG TAT AAA GCT GCT TTT ACA GAA TGT TGC CAA GCT GCT GAT AAA GCT 528  
 GCC TGC CTG TTG CCA AAG CTC GAT GAA CTT CGG GAT GAA GGG AAG GCT 576  
 TCG TCT GCC AAA CAG AGA CTC AAA TGT GCC AGT CTC CAA AAA TTT GGA 624  
 GAA AGA GCT TTC AAA GCA TGG GCA GTG GCT CGC CTG AGC CAG AGA TTT 672  
 CCC AAA GCT GAG TTT GCA GAA GTT TCC AAG TTA GTG ACA GAT CTT ACC 720  
 AAA GTC CAC ACG GAA TGC TGC CAT GGA GAT CTG CTT GAA TGT GCT GAT 768  
 GAC AGG GCG GAC CTT GCC AAG TAT ATC TGT GAA AAT CAG GAT TCG ATC 816  
 TCC AGT AAA CTG AAG GAA TGC TGT GAA AAA CCT CTG TTG GAA AAA TCC 864  
 CAC TGC ATT GCC GAA GTG GAA AAT GAT GAG ATG CCT GCT GAC TTG CCT 912  
 TCA TTA GCT GCT GAT TTT GTT GAA AGT AAG GAT GTT TGC AAA AAC TAT 960  
 GCT GAG GCA AAG GAT GTC TTC CTG GGC ATG TTT TTG TAT GAA TAT GCA 1008  
 AGA AGG CAT CCT GAT TAC TCT GTC GTG CTG CTG CTG AGA CTT GCC AAG 1056  
 ACA TAT GAA ACC ACT CTA GAG AAG TGC TGT GCC GCT GCA GAT CCT CAT 1104  
 GAA TGC TAT GCC AAA GTG TTC GAT GAA TTT AAA CCT CTT GTG GAA GAG 1152  
 CCT CAG AAT TTA ATC AAA CAA AAC TGT GAG CTT TTT AAG CAG CTT GGA 1200  
 GAG TAC AAA TTC CAG AAT GCG CTA TTA GTT CGT TAC ACC AAG AAA GTA 1248  
 CCC CAA GTG TCA ACT CCA ACT CTT GTA GAG GTC TCA AGA AAC CTA GGA 1296  
 AAA GTG GGC AGC AAA TGT TGT AAA CAT CCT GAA GCA AAA AGA ATG CCC 1344  
 TGT GCA GAA GAC TAT CTA TCC GTG GTC CTG AAC CAG TTA TGT GTG TTG 1392  
 CAT GAG AAA ACG CCA GTA AGT GAC AGA GTC ACA AAA TGC TGC ACA GAG 1440  
 TCC TTG GTG AAC AGG CGA CCA TGC TTT TCA GCT CTG GAA GTC GAT GAA 1488  
 ACA TAC GTT CCC AAA GAG TTT AAT GCT GAA ACA TTC ACC TTC CAT GCA 1536  
 GAT ATA TGC ACA CTT TCT GAG AAG GAG AGA CAA ATC AAG AAA CAA ACT 1584  
 GCA CTT GTT GAG CTT GTG AAA CAC AAG CCC AAG GCA ACA AAA GAG CAA 1632  
 CTG AAA GCT GTT ATG GAT GAT TTC GCA GCT TTT GTA GAG AAG TGC TGC 1680  
 AAG GCT GAC GAT AAG GAG ACC TGC TTT GCC GAG GAG GGT AAA AAA CTT 1728  
 GTT GCT GCA AGT CAA GCT GCC TTA GGC TTA TAC ATG GCC GAG GAC GGT 1776  
 GAC GCC AAG ACC GAC CAA GCT GAG AAG GCT GAG GGT GCC GGT GAC GCC 1824  
 AAG TAA 1830

配列番号: 10

配列の長さ: 73

配列の型: 核酸

\* 鎖の数: 一本鎖

トポロジー: 直鎖状

\* 配列の種類: 他の核酸 合成DNA

配列

GATCC ATG GCC GAG GAC GGT GAC GCC AAG ACC GAC CAA GCT GAG AAG GCT 50  
 GAG GGT GCC GGT GAC GCC AAG TA 73

配列番号: 11

配列の長さ: 73

配列の型: 核酸

鎖の数: 一本鎖

※トポロジー: 直鎖状

配列の種類: 他の核酸 合成DNA

アンチセンス: Yes

※

配列

AGCTTA CTT GGC GTC ACC GGC ACC CTC AGC CTT CTC AGC TTG GTC GGT CTT 51  
 GGC GTC ACC GTC CTC GGC CAT G 73

配列番号: 12

50 配列の長さ: 28

39	40
配列の型：核酸 鎖の数：一本鎖	* トポロジー：直鎖状 * 配列の種類：他の核酸 合成DNA
配列 AGACCATGGA TGCACACAAG AGTGAGGT	28
配列番号：13 配列の長さ：20 配列の型：核酸	※鎖の数：一本鎖 トポロジー：直鎖状 ※ 配列の種類：他の核酸 合成DNA
配列 AATAAGCTTT TGATCTTCAT	20
配列番号：14 配列の長さ：20 配列の型：核酸	10★鎖の数：一本鎖 トポロジー：直鎖状 ★ 配列の種類：他の核酸 合成DNA
配列 AGCAAGCTTT GGCAACAGGC	20
配列番号：15 配列の長さ：29 配列の型：核酸	☆鎖の数：一本鎖 トポロジー：直鎖状 ☆ 配列の種類：他の核酸 合成DNA
配列 AGCAAGCTTG ATGAACTTCG GGATGAAGG	29
配列番号：16 配列の長さ：24 配列の型：核酸	20◆鎖の数：一本鎖 トポロジー：直鎖状 ◆ 配列の種類：他の核酸 合成DNA
配列 AGCGAATTCA TCGAACACTT TGCC	24
配列番号：17 配列の長さ：29 配列の型：核酸	*鎖の数：一本鎖 トポロジー：直鎖状 *
配列 AGCGAATTCA AACCTCTTGT GGAAGAGCC	29
配列番号：18 配列の長さ：40 配列の型：核酸	30※鎖の数：一本鎖 トポロジー：直鎖状 ※ 配列の種類：他の核酸 合成DNA
配列 AAGAAGCTTG AATTCACATG TATAAGCCTA AGGCAGCTTG	40
配列番号：19 配列の長さ：25 配列の型：核酸	★鎖の数：一本鎖 トポロジー：直鎖状 ★ 配列の種類：他の核酸 合成DNA
配列 AGCCCATGGC CGAGGACGGT GACGC	25
配列番号：20 配列の長さ：29 配列の型：核酸	40☆鎖の数：一本鎖 トポロジー：直鎖状 ☆ 配列の種類：他の核酸 合成DNA
配列 AGCCCATGGC TTGGCGACAC CGGCACCCT	29
配列番号：21 配列の長さ：29 配列の型：核酸	◆鎖の数：一本鎖 トポロジー：直鎖状 ◆ 配列の種類：他の核酸 合成DNA
配列 AGCAAGCTTG CCGAGGACGG TGACGCCAA	29
配列番号：22	50 配列の長さ：26

41

42

配列の型：核酸  
鎖の数：一本鎖

配列

AGCAAGCTTG GCGACACCGG CACCCT

配列番号：23  
配列の長さ：29  
配列の型：核酸

配列

AGCGAATTCG CCGAGGACGG TGACGCCAA

配列番号：24  
配列の長さ：29  
配列の型：核酸

配列

AGCGAATTCG TTGGCGACAC CGGCACCCT

配列番号：25  
配列の長さ：71  
配列の型：核酸

配列

CC ATG GCC GAG GAC GGT GAC GCC AAG ACC GAC CAA GCT GAG AAG GCT GAG 50  
GGT GCC GGT GAC GCC AAG TAA 71

【図面の簡単な説明】

【図1】発現ベクターpTL2BmIの構成図である。  
【図2】SDS-PAGE観察図である。  
【図3】ウエスタンブロット観察図である。  
【図4】癌細胞浸潤阻害活性測定結果を示すグラフであ

\* トポロジー：直鎖状  
\* 配列の種類：他の核酸 合成DNA

26

※鎖の数：一本鎖  
トポロジー：直鎖状

\* 配列の種類：他の核酸 合成DNA

29

10★鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

★ 配列の種類：他の核酸 合成DNA

29

☆鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

☆ 配列の種類：他の核酸 合成DNA

71

る。

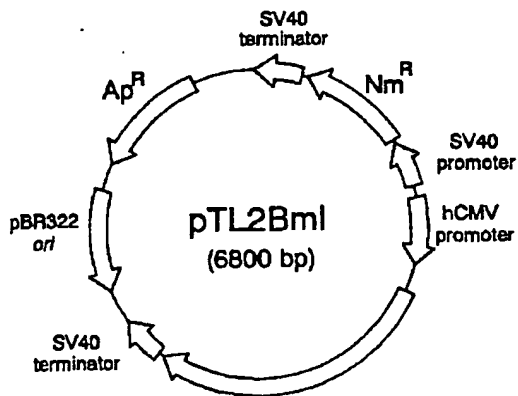
【図5】発現ベクターpRL2Lの構成図である。

【図6】発現ベクターpRL2Mの構成図である。

【図7】発現ベクターpTL2Mの構成図である。

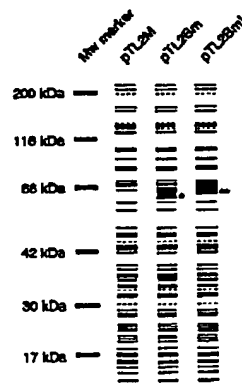
【図8】発現ベクターpTL2Bmの構成図である。

【図1】

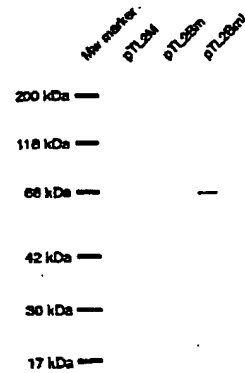


癌転移阻害蛋白質遺伝子

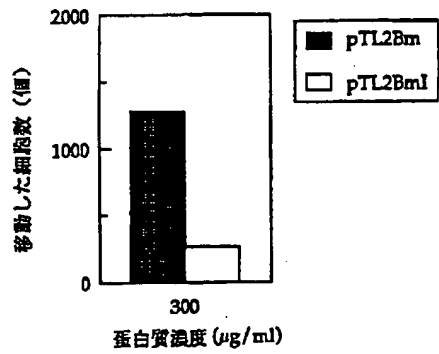
【図2】



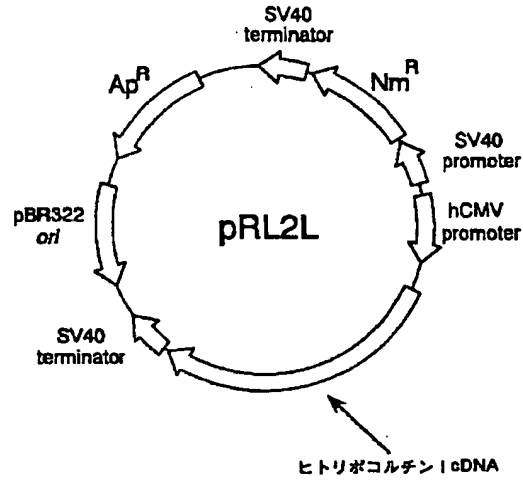
【図3】



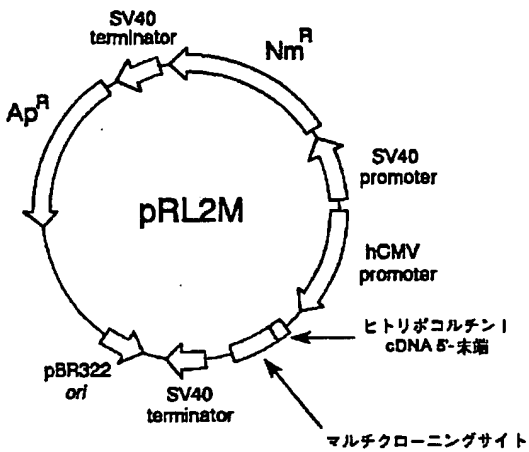
【図 4】



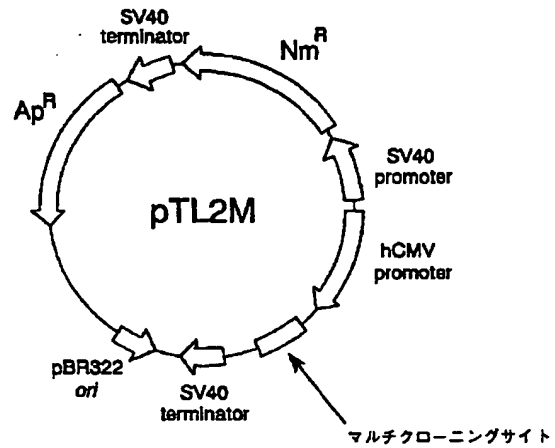
【図 5】



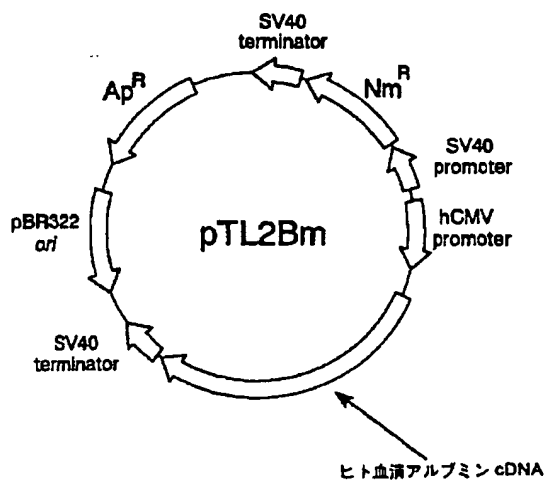
【図 6】



【図 7】



【図 8】





フロントページの続き

(51)Int.Cl. <sup>6</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
/(C 1 2 N 1/19				
C 1 2 R 1:645)				
(C 1 2 P 21/02				
C 1 2 R 1:645)				

(72)発明者 塚本 洋子  
 神奈川県横浜市神奈川区羽沢町1150番地  
 旭硝子株式会社中央研究所内

(72)発明者 磯合 敦  
 神奈川県横浜市神奈川区羽沢町1150番地  
 旭硝子株式会社中央研究所内  
 (72)発明者 熊谷 博道  
 神奈川県横浜市神奈川区羽沢町1150番地  
 旭硝子株式会社中央研究所内

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**